

EFFECTO DE LA ELECCIÓN DEL GRUPO EXTERNO PARA RECUPERAR LAS RELACIONES FILOGENÉTICAS DE GASTROPODA (MOLLUSCA) UTILIZANDO GENOMAS MITOCONDRIALES COMPLETOS

SELECTION EFFECT OF THE OUTGROUP IN THE RECOVERING THE PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF GASTROPODA (MOLLUSCA) USING COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOMES

Juan Esteban Uribe y Lyda Raquel Castro

RESUMEN

Las relaciones evolutivas en la Clase Gastropoda no están resueltas y existen varias hipótesis diferentes. Aquí, se evalúa el efecto de la escogencia del grupo externo en la topología de los árboles del grupo de interés, teniendo en cuenta que no hay un consenso sobre el grupo filogenéticamente más cercano a los gasterópodos. Se hicieron cuatro tipos de tratamientos con las clases de moluscos hipotéticamente más cercanas a los gasterópodos como grupo externos Cephalopoda, Scaphopoda, Bivalvia y todos combinados. Se evaluaron dos tipos de codificaciones genéticas (aminoácidos y secuencias de nucleótidos sin la tercera posición del codón) y a cada uno se aplicaron dos análisis (parsimonia y bayesiano), para un total de 16 análisis. Para todos los análisis, tanto parsimonia como bayesianos, las relaciones entre grupo interno y grupo externo no fueron claras al utilizar Scaphopoda como grupo externo, ya que se mezcla con el grupo de interés. Lo mismo sucede con los análisis de Bivalvia, sin la tercera posición del codón para el análisis de parsimonia. Las relaciones más estables con relación al grupo interno y grupo externo se observaron en los análisis utilizando Cephalopoda con las dos codificaciones genéticas en los análisis de parsimonia y bayesianos. En la mayoría de los análisis se recupera el grupo [(Caenogastropoda + Neritimorpha) + Vetigastropoda] y el grupo (Patellogastropoda + Heterobranchia) con niveles significativos de apoyo estadístico. El grupo Eutyneura es parafilético con la inclusión de *Pyramidelloidea dolabrata*, miembro de los Heterostropha. Los análisis incluyendo todos los grupos externos tanto de parsimonia como bayesianos no resuelven las relaciones, ni de gasterópodos, ni de moluscos. En general, la topología de los árboles filogenéticos con genomas mitocondriales para los gasterópodos es afectada por la elección del grupo externo por lo que se recomienda una selección y evaluación cautelosa del mismo.

PALABRAS CLAVE: filogenia, gasterópodos, moluscos

ABSTRACT

Gastropod evolutionary relationships are still not resolved and there are different publications with different hypothesis. The main objective of this study was to evaluate the effect of outgroup choice on the topology of the ingroup, taking into account that there is not an agreement in regards to which is the more closely related group to gastropods. Four different treatments were performed using the different classes of Mollusks hypothetically closer to gastropods as outgroups (Cephalopoda, Scaphopoda, Bivalvia and a all combined). These treatments were performed with two different datasets (aminoacids and nucleotide sequences excluding third codon positions) and two analyses were applied to each dataset (Parsimony and Bayesian), for a total of 16 analyses. In all the analyses, the ingroup relationships are not well recovered when using Scaphopoda as outgroup, as it gets recovered within the ingroup. The same happened with Bivalvia when using Parsimony and the nucleotide dataset. The more stable relationships were observed when Cephalopoda was used as the outgroup, both in Parsimony and Bayesian analyses and with both type of datasets. In general, in most of the analysis we recovered the group ((Caenogastropoda + Neritimorpha) + Vetigastropoda), as well as the group (Patellogastropoda + Heterobranchia) with good statistical support. The Eutyneura group was recovered as paraphyletic for the inclusion of *Pyramidelloidea dolabrata* a Heterostropha member. The analyses including all the outgroups did not recovered well the relationship neither for Gastropoda nor for Mollusca. In general, the topologies of the phylogenetic trees using complete mitochondrial genomes on gastropods can be very affected by outgroup choice. We recommend precaution on the evaluation and selection of outgroups when working with this group.

KEY WORDS: phylogeny, gastropods, mollusks

Dirrección de los autores:

Universidad del Magdalena, Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Biología, Instituto de Investigaciones Tropicales (Intropic), Grupo de Investigación en Evolución, Sistemática y Ecología Molecular, Carrera 32 N0. 22-08, Apartado Postal 2-1-21630. Santa Marta, Colombia. jecuervo@hotmail.com, lcastro@unimagdalena.edu.co, (J.E.U., L.R.C.).



INTRODUCCIÓN

Actualmente, las relaciones evolutivas entre los principales grupos dentro de los gasterópodos son inconclusas. Las principales discusiones se dan por la discrepancia entre análisis evolutivos con datos morfológicos y moleculares. La monofilia de Pulmonata y Heterostropha dentro de los Heterobranchia está basada en análisis taxonómicos con caracteres morfológicos (Haszprunar, 1988; Ponder y Lyndberg, 1997), resultados que no concuerdan con la monofilia sugerida en recientes análisis con marcadores moleculares (Wollscheid y Wagele, 1999; Colgan et al., 2003; Remigio y Hebert, 2003; Grande et al., 2004; Klussmann-Kolb et al., 2008). Patellogastropoda, en análisis con caracteres morfológicos aparece como un grupo basal del enorme grupo Orthogastropoda (Ponder y Lindberg, 1997), mientras que en recientes análisis con marcadores mitocondriales aparece como un grupo hermano de Heterobranchia (Grande et al., 2008), rompiendo la hermandad planteada entre Caenogastropoda y Heterobranchia por análisis de caracteres morfológicos (Haszprunar, 1985; Haszprunar, 1988; Ponder y Lyndberg, 1997). En taxonomía con datos morfológicos el grupo Neritimorpha aparece como grupo hermano de Vetigastropoda y Apogastropoda (Harasewych, 2002), o como grupo hermano de Cocculiniformia y éstos a su vez como grupo hermano de Vetigastropoda y Apogastropoda (Ponder y Lindberg, 1997). Los análisis moleculares proponen a Vetigastropoda como grupo hermano de Neritimorpha y este clado como grupo hermano de Caenogastropoda y Heterobranchia (Colgan et al., 2007). La monofilia de Caenogastropoda tiene buen soporte basada en la morfología (Ponder y Lindberg, 1997), pero es ligeramente contradictoria en análisis de ADN (Colgan, 2003). Es evidente que son necesarios más datos y análisis para dar peso a estas hipótesis de relaciones evolutivas dentro de la clase Gastropoda.

Debido a su herencia materna, la falta de recombinación y la rápida tasa de evolución, los genomas mitocondriales (mt) han sido ampliamente utilizados para estudios de estructura genética, filogenética, filogeografía y en diferentes niveles taxonómicos (Yu et al., 2008). Estos genomas mt se han postulado como marcadores de gran utilidad por la cantidad de información que proporcionan los 37 genes incluidos en casi todos los genomas mt (22 genes transferencia, 13 genes codificantes de proteína, 2 genes ribosomales) (Wolstenholme, 1992).

Dentro de los invertebrados se han utilizado las secuencias completas y reorganización de genomas mt con éxito para resolver relaciones filogenéticas en varios grupos (Boore et al., 1998; Boore y Brown, 2000; Park et al., 2007). Particularmente, dentro de los gasterópodos los análisis muestran la monofilia de Opisthobranchia, tanto con rearrreglos genómicos como con secuencias completas (Grande et al., 2002) y resuelven las relaciones filogenéticas de los Eutheryneura (Grande et al., 2004) y los Neogasterópodos (Cunha et al., 2009). Sin embargo, las relaciones evolutivas con marcadores mitocondriales en gasterópodos han causado controversia por las contradicciones con las monofilias de varios grupos. Grande et al. (2002, 2004, 2008) y Cunha et al. (2009), proponen los alineamientos de aminoácidos como los principales datos de comparación para los análisis de inferencia filogenética. Otros consideran las secuencias de aminoácidos y nucleótidos (utilizando sólo la primera y segunda posición del codón) como los datos más adecuados para reconstrucción filogenética de grupos distantes (Russo et al., 1996; Simmons et al., 2004; Gissi et al., 2006; Cunha et al., 2009). Adicionalmente, en ninguno de estos trabajos se ha evaluado la importancia del grupo externo (outgroup) en las recuperaciones de los árboles y en los alineamientos.

La elección del grupo externo lleva dos aspectos importantes, el primero es que el grupo externo debe estar fuera del grupo de interés y el segundo, no debe estar muy alejado para que las diferencias acumuladas entre el grupo de interés y el grupo externo no hagan los análisis de las relaciones evolutivas más complicadas, presentando problemas de alineamiento (Cameron et al., 2004). Rota-Stabelli y Telford (2008) incluso sugieren que la habilidad de los genomas mt para resolver relaciones filogenéticas depende de la escogencia del grupo externo. Esto es importante debido a que los taxones del grupo externo pueden determinar si el carácter comparado con el grupo interno es plesiomórfico o simplemente es otro estado (Wheeler, 1990). Cameron et al. (2004) realizaron un trabajo con el objetivo de resolver ambigüedades en los grupos Entognatha, Insecta y Crustacea y analizaron el comportamiento de los alineamientos y de los árboles con diferentes grupos externos, los resultados muestran que mientras más alejado esté el grupo externo menos resolución y menor peso estadístico presentan los árboles.

Por otro lado, Castro y Dowton (2006) analizaron la habilidad de los genomas mitocondriales completos

para resolver una filogenia prueba utilizando diferentes tipos de análisis. Ellos encontraron que el muestreo de taxones es muy importante, no sólo en el grupo interno sino en el grupo externo. Su filogenia prueba, en el caso de Himenoptera, se recuperaba con más soporte y mayor número de veces, cuando se incluían todos los Holometabola como grupo externo, en vez de solo un taxón.

La posición de la clase Gastropoda, en relación con las principales clases dentro del filum Mollusca (Cephalopoda, Scaphopoda, Bivalvia, Polyplacophora, Aplacophora) es controversial. Waller (1998) propone en la parte más basal del árbol a los Monoplacophora seguido en orden divergente de Bivalvia, Gastropoda, Scaphopoda y Cephalopoda finalmente como grupos hermanos (Monoplacophora (Bivalvia (Gastropoda (Scaphopoda + Cephalopoda)))). Haszprunar (2000) propone a Scaphopoda como grupo hermano de Cephalopoda + Gastropoda, estos dos en la parte terminal del árbol (Monoplacophora (Bivalvia (Scaphopoda (Gastropoda + Cephalopoda)))). Los cefalópodos en recientes análisis con genomas mitocondriales, se muestran como grupo hermano de los gasterópodos con un peso estadístico en el nodo mayor a 95% de bootstrap (Podsiadlowski et al., 2009), cabe aclarar que, en estos análisis no incluyen representación de la clase Scaphopoda. Más recientemente, utilizando aproximaciones filogenómicas (datos genómicos y transcriptómicos), Smith et al. (2011) resuelven a Gastropoda como grupo hermano de Scaphopoda, mientras que Kocot et al. (2011), sugieren a los bivalvos como el grupo más cercanamente relacionado a los gasterópodos.

Estudios recientes han tratado de resolver al filogenia de Gastropoda utilizando Cephalopoda como grupo externo (Colgan et al., 2003; Grande et al., 2004; 2008), otros estudios utilizan Polyplacophora (Remigio y Hebert, 2003) y Bivalvia (Winnepenninckx et al., 1998), o una mezcla de Cephalopoda y Polyplacofora (Castro y Colgan, 2010). Como se mencionó en el párrafo anterior, teniendo en cuenta que el grupo hermano de Gasteropoda es controversial, es pertinente hacer un análisis de sensibilidad que nos permita evaluar el efecto del grupo externo utilizado sobre la filogenia obtenida para los Gasterópodos.

En este trabajo se evalúa el efecto de la escogencia de diferentes grupos externos así como aumentar el

muestreo de taxa en el grupo externo para resolver la relaciones filogenéticas de Gasterópodos utilizando genomas mt, utilizando el mismo muestreo de taxa que utilizaron Castro y Colgan (2010). Se comparan los análisis utilizando nucleótidos excluyendo los codones de tercera posición y los análisis utilizando proteínas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección de secuencias

Se obtuvieron los genomas mitocondriales de 32 moluscos (21 gasterópodos, cinco cefalópodos, dos escalopados y cuatro bivalvos) y de dos anélidos disponibles en GenBank. Estos genomas se almacenaron como genes homólogos para la obtención de buenos alineamientos y análisis filogenéticos (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de taxones de Mollusca incluidos en los análisis.

Taxones	# Acceso Gen Bank
Gastropoda (grupo interno)	
Opisthobranchia	
1. <i>Pupa strigosa</i>	AB028237
2. <i>Roboastra europaea</i>	AY083457
3. <i>Aplysia californica</i>	AY569552
4. <i>Elysia chlorotica</i>	NC_010567
5. <i>Ascobulla fragilis</i>	AY098929
Pulmonata	
6. <i>Albinaria coerulea</i>	X83390
7. <i>Cepaea nemoralis</i>	U23045
8. <i>Biomphalaria glabrata</i>	AY380530
9. <i>Siphonaria pectinata</i>	AY345049
10. <i>Onchidella celtica</i>	AY345048
11. <i>Myosotella myosotis</i>	AY345053
Pyramidelloidea	
12. <i>Pyramidella dolabrata</i>	AY345054
Caenogastropoda	
13. <i>Oncomelania hupensis hupensis</i>	NC_012899
14. <i>Ilyanassa obsoleta</i>	DQ_238598
15. <i>Rapana venosa</i>	NC_011193
16. <i>Conus textile</i>	NC_008797
17. <i>Thais clavigera</i>	NC_010090



Continuación de la Tabla 1.

18. <i>Lophiotoma cerithiformis</i>	DQ284754
Vetigastropoda	
19. <i>Haliotis rubra</i>	AY588938
Patellogastropoda	
20. <i>Lottia digitalis</i>	DQ238599
Neritimorpha	
21. <i>Nerita melanotragus</i>	GU810158
Cephalopoda (grupo externo)	
22. <i>Octopus vulgaris</i>	NC_006353
23. <i>Loligo bleekeri</i>	NC_002507
24. <i>Sepia esculenta</i>	NC_009690
25. <i>Vampyroteuthis infernalis</i>	NC_009689
26. <i>Nautilus macromphalus</i>	NC_007980
Scaphopoda (grupo externo)	
27. <i>Siphonodentalium lobatum</i>	NC_005840
28. <i>Graptacme eborea</i>	NC_006162
Bivalvia (grupo externo)	
29. <i>Cristaria plicata</i>	NC_012716
30. <i>Lampsilis ornata</i>	NC_005335
31. <i>Hyriopsis cumingii</i>	NC_011763
32. <i>Loripes lacteus</i>	NC_013271
Annelida (grupo externo)	
33. <i>Lumbricus terrestris</i>	NC_001673
34. <i>Platynereis dumerilii</i>	NC_000931

Alineamientos

Las secuencias se editaron en el programa BIOEDIT (Hall, 1999), luego se importaron al programa MEGA 4.0.2 (Tamura et al., 2007) para hacer los alineamientos múltiples con Clustal W (Higgins et al., 1994). Los alineamientos de nucleótidos se realizaron con base en alineamiento de aminoácidos (Castro y Dowton, 2005). Las características asignadas para los alineamientos por medio del Clustal (Thompson et al., 1997), para los genes que codifican para proteínas fueron: parámetro alineamiento pairwise: gap penalties abierto = 10, extensión de gap penalties = 0,1; alineamiento múltiple: gap penalties abierto = 10, extensión de gap penalties = 0,2; matriz de peso de proteína = residuo de Gonnet específicas de penalties = encendido; penalties hidrofóbicos = encendido; distancia de separación del gap = 4; separación final del gap = apagado; matriz negativa = apagado; retraso divergente de corte-apagado = 30%. Las características asignadas para el alineamiento de las regiones de ARN fueron:

parámetro alineamiento pairwise: gap penalties abierto = 15, extensión de gap penalties = 6,66; alineamiento múltiple: gap penalties abierto = 15, extensión de gap penalties = 6,66; matriz de peso de ADN = IUB; peso de transición = 0,5; matriz negativa = apagado; retraso divergente de corte-apagado = 30%.

Se hicieron cuatro tipos diferentes de alineamientos: a) alineamientos de Gasterópodos con Cefalópodos como grupo externo; b) alineamiento de Gasterópodos con Escafópodos como grupo externo; c) alineamientos de Gasterópodos con Bivalvos como grupo externo; y d) alineamientos de Gasterópodos con todos los grupos externos incluidos.

Obtención de modelos evolutivos

Los modelos de sustitución de nucleótidos se obtuvieron en MrModeltest 2.3 (Nylander, 2008) para las secuencias de cada gen. Para la mayoría de genes el modelo evolutivo fue el mismo (GTR + I + G), excepto para Nad4L que obtuvo el modelo evolutivo GTR + G. El modelo evolutivo que se utilizó para las secuencias de aminoácidos fue Met-Rev obtenido de (Grande et al., 2004).

Análisis de sensibilidad de grupo externo

Los alineamientos de nucleótidos y aminoácidos fueron utilizados para reconstrucción filogenética utilizando métodos de Máxima Parsimonia (MP) e Inferencia Bayesiana (IB). Los análisis de Máxima Parsimonia (MP) se realizaron en PAUP* versión 4.0b10 de Swofford (2002); y se incluyó un análisis de remuestreo computacional (bootstrap) de 100 repeticiones. Los análisis de Inferencia Bayesiana (IB) se realizaron en MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) simulando un Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo (MCMCMC), con un número de 1000000 de generaciones, impresión a la pantalla cada 1000 generaciones y una frecuencia de muestreo cada 100 generaciones. Los árboles de IB resultantes se evaluaron mediante probabilidad Bayesiana a posteriori (DPAP). Los árboles suministrados por los análisis en MrBayes v3.1.2 y PAUP* 4.0b10 se observaron en el programa de gráficos TreeView 1.6.6 (Roderick, 2001).

Se combinaron los set de genes para los análisis filogenéticos y se realizaron los siguientes análisis: 1) 12 genes que codifican para proteína excluyendo los codones de la tercera posición más ARNr 12S y 16S en secuencia de nucleótidos (3no); 2) 12 genes que codifican para proteína en secuencias de aminoácidos (P).



Los análisis filogenéticos de Parsimonia y de Inferencia Bayesiana se realizaron de la siguiente manera; Ceph-3no: Cefalópodos como grupo externo con secuencias de nucleótidos excluyendo los codones de la tercera posición; Ceph-P: Cefalópodos como grupo externo con secuencias de proteínas; Biv-3no: Bivalvos como grupo externo con secuencias de nucleótidos excluyendo los codones de la tercera posición; Biv-P: Bivalvos como grupo externo con secuencias de proteínas; Scap-3no: Escafópodos como grupo externo con secuencias de nucleótidos excluyendo los codones de la tercera posición; Scap-P: Escafópodos como grupo externo con secuencias de proteínas; Todos-3no: Cefalópodos, Escafópodos, Bivalvos y Anélidos como grupo externo con secuencias de nucleótidos excluyendo los codones

de la tercera posición; Cefalópodos, Escafópodos, Bivalvos y Anélidos como grupo externo con secuencias de proteínas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de sensibilidad de grupos externos

Para tres de los análisis de parsimonia (Biv-3no, Scap-3no y Scap-P), el grupo externo se mezcla con el grupo interno y no se recupera la monofilia de los gastrópodos. Por el contrario, en los análisis Ceph-3no, Ceph-P y Biv-P, el grupo de interés es recuperado como grupo natural (Tabla 2).

Tabla 2. Comparaciones de los árboles recuperados de los diferentes conjuntos de datos y tratamientos utilizando análisis de Parsimonia: *si*, denota la monofilia del grupo soportado por la búsqueda heurística; *si +*, denota la monofilia del grupo soportado por un valor bootstrap mayor a 80%; *no*, no se mantiene la monifilia del grupo; en los restantes, el grupo no está incluido en el análisis. Los tratamientos de los grupos externos se clasificaron de la siguiente manera:

Soporte de monofilia	Ceph-P	Ceph-3no	Biv-P	Biv-3no	Scaph-P	Scaph-3no	Todos-P	Todos-3no
<i>Vetigastropoda</i>	si +	si +	si +	si +	si +	si +	si +	si
<i>Neritimorpha</i>	si +	si +	si +	si +	si +	si +	si +	si +
<i>Caenogastropa</i>	si +	si +	si +	si +	si +	si +	si +	si +
<i>Pulmonata</i>	no	no	no	no	no	no	no	no
<i>Opisthobranchia</i>	no	no	no	si	no	no	no	no
<i>Patellogastropoda</i>	si +	si +	si	si +	si	si	si	si
<i>Piramidelloidea</i>	si +	si	si +	si	si +	si	si +	si
<i>Cephalopoda</i>	si +	si +	---	---	---	---	si +	no
<i>Bivalvia</i>	---	---	si +	no	---	---	si	no
<i>Scaphopoda</i>	---	---	---	---	no	si	si	si +
<i>Annelida</i>	---	---	---	---	---	---	si	si
<i>Eogastropoda</i>	no	no	no	no	no	no	no	no
<i>Orthogastropoda</i>	no	no	no	no	no	no	no	no
<i>Apogastropoda</i>	no	no	no	no	no	no	no	no
<i>Heterobranchia</i>	si +	si +	si	si	si +	si +	si	si +
<i>Euthyneura</i>	no	no	no	no	no	no	no	no

En los análisis con el grupo externo Cephalopoda (Ceph.3no y Ceph-P) fueron inferidos dentro de los gasterópodos dos grupos con un soporte bootstrap de más de 95% en las ramas: el grupo [(Caenogastropoda + Neritimorpha) + Vetigastropoda]; y el grupo (Patellogastropoda + Heterobranchia). Estos mismos grupos también son inferidos en el análisis de Biv-P, en este caso con un soporte bootstrap de 65%, y también

se recuperan en recientes análisis de Castro y Colgan (2010). Los caenogastrópodos se agruparon en los ocho árboles analizados con una recuperación en las ramas de más de un 97% bootstrap, excepto en Todos-3no con porcentaje bootstrap menor al 50%. [(Caenogastropoda + Neritimorpha) + Vetigastropoda] son relacionados en siete análisis con apoyo bootstrap mayor al 98% en las ramas y sólo en Todos-3no no fueron recuperados.



Los Heterobranchia y los Patellogastropoda fueron recuperados como grupos hermanos en Ceph-3no, Ceph-P y Biv-P con una bootstrap mayor al 98% en las ramas, esto contradice, al igual que la relación de ((Caenogastropoda + Neritimorpha) + Vetigastropoda), el antiguo clado Apogastropoda (Caenogastropoda + Heterobranchia) propuesto por Ponder y Lindberg (1997) con análisis morfológicos y apoyado en algunos análisis moleculares (Winnepeenninckx et al., 1998; Thollessen, 1999; Remigio y Hebert, 2003).

Los Heterobranchia se agruparon en todos los análisis de parsimonia, en tres de ellos con peso estadístico mayor al 90 % (Ceph-3no, Ceph-P y Todos-3no). En los análisis de Biv-3no y Biv-P, Scap-3no y Scap-P y Todos-P se agruparon con un soporte inferior al 80%. En todos los análisis, los Eutyneura son parafiléticos por la inclusión de *Pyramidella dolabrata* (miembro de los Heterostropha), dentro de los Pulmonados (Tabla 2), estos resultados coinciden con otros análisis realizados con marcadores mitocondriales (Grande et al. 2004; 2008; Castro y Colgan, 2010). Los Pulmonados no se recobran como grupo monofilético en los análisis; primero, por la aparición de *Pyramidella dolabrata*; segundo, por la estrecha relación de *Siphnaria pectinata* con Opisthobranchia. Los opisthobranquios, solo se muestran como grupo monofilético en el análisis Biv-3no, con un peso estadístico menor a 80% (Tabla 2). Estos resultados coinciden con los propuestos por otros autores (Remigio y Hebert, 2003; Grande et al., 2004; Castro y Colgan, 2010).

En los análisis Todos-3no, los gasterópodos, cefalópodos y escafópodos no son recuperados como grupo natural. En los análisis de Todos-P, se recuperan como grupo natural los cefalópodos y los bivalvos con soporte bootstrap menor al 50% en las ramas. Evidentemente, los análisis de Todos-P y Todos-3no no parecen resolver la relación entre Moluscos, esto podría ser por problemas en los alineamientos o poca eficiencia de algunos genes codificantes para proteína para la diferenciación entre grupos.

Los tratamientos que mostraron mejores resultados estadísticos fueron los análisis de Bivalvia, seguido de los Scaphopoda. En general, los Scaphopoda mostraron los mayores Índices de Retención (RI), los bivalvos mostraron los mayores Índices de Consistencia (CI) y Caracteres Informativos (CInf) en sus árboles, estos dos seguidos por los cefalópodos (Tabla 3). Los árboles obtenidos de los análisis con secuencias de

aminoácidos mostraron ser más conservativos, ya que los valores en los ICs fueron más altos que los obtenidos para los árboles con secuencias de nucleótidos sin la tercera posición del codón, aún habiendo tomado los alineamientos de aminoácidos como guía para alineamientos de nucleótidos. Estos resultados fueron congruentes con el trabajo de sensibilidad de grupo externo y de diferente codificación genética hecho para Entognatha (Cameron et al., 2004).

Tabla 3. Estadística de los árboles Parsimonia. IC: índice de consistencia; IR: índice de retención; CR: índice de consistencia reescalado; CInf: caracteres informativos.

Análisis	No. Sitios	Long árbol	IC	IR	CR	CInf
Ceph-Pro	3635	22413	0,6071	0,5528	0,3356	2455
Ceph-3no	9149	41128	0,3733	0,4482	0,1673	5915
Biv-Pro	3644	21778	0,626	0,5624	0,3521	2500
Biv-3no	9153	40388	0,3866	0,4548	0,1758	6001
Scap-Pro	3640	20952	0,6380	0,5231	0,3338	2415
Scap-3no	9040	38039	0,3974	0,4199	0,1669	5779
Todos-Pro	3600	33198	0,511	0,4769	0,2437	2655
Todos-3no	8143	53455	0,2862	0,3804	0,1089	5863

Los estadísticos en los análisis bayesianos (probabilidad posterior) muestran ser menos conservadores que los bootstrap de los análisis de parsimonia. La monofilia de los gasterópodos se recuperó en cinco análisis (Ceph-3no, Ceph-P, Biv-3no, Biv-P y Scap-3no), sólo en un análisis (Scap-3no) se observa una politomía en la raíz del árbol, donde no quedan muy claras las relaciones entre grupo externo y grupo interno. En el análisis Scap-P, el grupo de gasterópodos se recupera como parafilético relacionando *Siphonodentalium lobatum* (Scaphopoda) con *Lottia digitalis* (Gastropoda).

El grupo ((Caenogastropoda + Neritimorpha) + Vetigastropoda) es recuperado en seis análisis bayesianos (Ceph-3no, Ceph-P, Biv-P, Scap-3no, Scap-P y Todos-P) con una probabilidad posterior de 1,0 en las ramas, exceptuando en el análisis Scap-P, donde se presenta una politomía en la raíz del árbol y se recupera con una probabilidad posterior menor a 0.5. EL grupo (Patellogastropoda + Heterobranchia), se recuperó en seis análisis, en cinco de ellos (Ceph-3no, Ceph-P, Biv-3no, Biv-P y Scap-3no) con probabilidad posterior de 1.0 y en uno de ellos (Todos-P), con una probabilidad posterior inferior

a 0.8. Los Heterobranchia son parafiléticos en todos los análisis utilizando parsimonia. Los pulmonados no se recuperaron como grupo natural y los opistobranquios

sólo se recuperaron como grupo monofilético en Biv-3no y Todos-3no, con probabilidad posterior inferior a 0.8 en las ramas (Tabla 4).

Tabla 4. Comparaciones de los árboles recuperados de los diferentes conjuntos de datos y tratamientos con análisis Bayesiano: *si*, denota la monofilia del grupo con menos del 80% de probabilidad posterior; *si +*, denota la monofilia del grupo con una probabilidad posterior mayor al 80%; *no*, no se mantiene la monofilia del grupo; en los restantes, el grupo, no está incluido en el análisis. Los tratamientos de los grupos externos se clasificaron de la siguiente manera:

Soporte de monofilia	Ceph-P	Ceph-3no	Biv_P	Biv-3no	Scaph-P	Scaph-3no	Todos-P	Todos-3no
Vetigastropoda	si +	si +	si +	si +	si +	si +	si +	si +
Neritimorpha	si +	si +	si +	si +	si +	si +	si +	si +
Caenogastropoda	si +	si +	si +	si +	si +	si +	si +	si +
Pulmonata	no	no	no	no	no	no	no	no
Opisthobranchia	no	no	no	si	no	no	no	si
Patellogastropoda	si +	si +	si +	si +	si	si +	si +	si +
Piramidelloidea	si +	si	si +	si	si +	si +	si +	si +
Cephalopoda	si +	si +	---	---	---	---	si +	si +
Bivalvia	---	---	si +	si +	---	---	si +	no
Scaphopoda	---	---	---	---	no	si	si	si +
Polyplacophora	---	---	---	---	---	---	si +	si +
Annelida	---	---	---	---	---	---	si	si +
Eogastropoda*	no	no	no	no	no	no	no	no
Orthogastropoda	no	no	no	no	no	no	no	no
Apogastropoda	no	no	no	no	no	no	no	no
Heterobranchia	si +	si +	si +	si	si +	si +	si	si
Euthyneura	no	no	no	no	no	no	no	no

CONCLUSIONES

Los análisis de nucleótidos excluyendo los codones de la tercera posición (3no) arrojaron árboles similares a los de aminoácidos. Este resultado era de esperarse ya que la mayoría de aminoácidos son redundantes en esta posición. Este trabajo comprueba que la escogencia del grupo externo afecta las relaciones filogenéticas de los gasterópodos cuando se utilizan genomas mt. Sin embargo, entre los agrupamientos que se recuperan un mayor número de veces y con mas soporte encontramos a ((Caenogastropoda + Neritimorpha) + Vetigastropoda), (Heterobranchia + Patellogastropoda) y en los Eutyneura (Pulmonata + Piramidelloidea).

El mejor comportamiento de los tratamientos en los análisis de parsimonia con referencia a los índices

estadísticos lo presentaron los bivalvos con el mayor (IR y CR) y el mayor numero de caracteres informativos para el caso de Biv-P. El mayor índice de consistencia lo presentaron los Scaphopoda. Estos índices, sin embargo, no parecen ser de mucha utilidad para la escogencia del grupo externo. El comportamiento más claro entre grupo interno y grupo externo en los análisis de parsimonia se presentó en los tratamientos de cefalópodos y de Biv-P, mientras que en los análisis bayesianos los tratamientos estuvieron más estables, y sólo en el análisis Scap-P se mezcló el grupo externo con el grupo interno. Scaphopoda, no presentó un buen comportamiento como grupo externo de los análisis de gasterópodos a pesar de que en hipótesis hechas por diferentes autores son mostrados como el grupo más cercano a Gastropoda (Waller, 1998; Haszprunar, 2000, Smith et al., 2011).



En los análisis, aumentamos el número de muestreo en el grupo externo para tratar de resolver las relaciones entre el grupo interno en los tratamientos (Todos-3no y Todos-P) para los análisis bayesianos y de parsimonia. Sin embargo, los resultados no fueron satisfactorios, el grupo Gasterópoda no se recuperó como grupo natural en ninguno de los casos. En este análisis se incluyó el grupo Anélidos, sugerido por Konot et al. (2011), como grupo más cercano a los Mollusca, sin embargo, los grupos externos muy alejados al grupo de interés pueden presentar acumulación de mutaciones muy grandes en la historia evolutiva que se enmascaran en las secuencias, esto puede afectar los alineamientos drásticamente (Winnepeninckx et al. 1996; Cameron et al. 2004) y esto posiblemente es la causa de no recuperar la monofilia de los gasterópodos.

Este estudio demuestra que la escogencia del grupo externo afecta las relaciones en el grupo de interés (gasterópodos en nuestro caso). Los resultados más consistentes, sin embargo, se obtienen cuando se utiliza a los cefalópodos como grupo externo. Se enfatiza la importancia, para cualquier análisis filogenético, de realizar un estudio cuidadoso en cuanto a qué grupo puede ser más óptimo para ser utilizado como grupo externo.

BIBLIOGRAFÍA

- Boore, J. L., D. Lavrov y W. M. Brown. 1998. Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature*, 392:667-668
- Boore J. L. y W. M. Brown. 2000. Mitochondrial Genomes of Galathealium, Helobdella, and Platynereis: Sequence and Gene Arrangement Comparisons Indicate that Pogonophorals Not a Phylum and Annelida and Arthropoda Are Not Sister Taxa. University of Michigan. *Molecular Biology and Evolution* 17(1):87-106.
- Cameron, S. L., K. B. Miller, C. A. D'haese, M. F. Whiting y S. C. Barker. 2004. Mitochondrial genome data alone are not enough to unambiguously resolve the relationships of Entognatha, Insecta and Crustacea *sensu lato* (Arthropoda). *Cladistics* 20: 534 -557.
- Castro, L. R. y D. J. Colgan. 2010. The phylogenetic position of Neritimorpha based on the mitochondrial genome of *Nerita melanotragus* (Mollusca: Gastropoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57 (2): 918 -23.
- Castro, L. R. y M. Dowton. 2005. The position of the Hymenoptera within the Holometabola as inferred from the mitochondrial genome of *Perga condei* (Hymenoptera: Symphyta: Pergidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 469 -479.
- Castro, L. R. y M. Dowton. 2006. Molecular Bayesian Analysis of the Apocrita (Insecta: Hymenoptera) suggests that the Chalcidoidea are sister to the (Monomachidae + Diapriidae + Maamingidae). *Invertebrate Systematics* 20: 603 -614.
- Colgan, D. J., W. F. Ponder, E. Beacham y J. M. Macaranas. 2003. Gastropod phylogeny based on six segments from four genes representing coding or non-coding and mitochondrial or nuclear DNA. *Molluscan Research* 23: 123-148.
- Colgan, D. J., W. F. Ponder, E. Beacham y J. M. Macaranas. 2007. Molecular phylogenetic Caenogastropoda (Gastropoda: Mollusca). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 717 -737.
- Cunha, R., C. Y. Grande y R. Zardoya 2009. Neogastropod phylogenetic relationships based on entire mitochondrial genomes. *Evolutionary Biology* 9: 210.
- Gissi, C., D. S. Mauro, G. Pesole y R. Zardoya 2006. Mitochondrial phylogeny of Anura (Amphibia): A case study of congruent phylogenetic reconstruction using amino acid and nucleotide characters. *Gene* 366: 228 -237.
- Grande, C., J. Templado, J. L. Cervera y R. Zardoya. 2002. The complete mitochondrial genome of the nudibranch *Roboastrea europaea* (Mollusca: Gastropoda) supports the monophyly of opisthobranchs. *Molecular Biology and Evolution* 19: 1672 -1685.
- Grande, C., J. Templado, J. L. Cervera y R. Zardoya. 2004. Molecular phylogeny of *Euthyneura* (Mollusca: Gastropoda). *Molecular Biology and Evolution* 21: 303 -313.
- Grande, C., J. Templado y R. Zardoya. 2008. Evolution of gastropod mitochondrial genome arrangements. *Evolutionary Biology* 8: 61.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95 -98.
- Harasewych, M. G. 2002. Pleurotomarioidean gastropods. *Advances in Marine Biology* 42: 235 -292.
- Haszprunar, G. 1985. The fine morphology of the osphradial sense organs of the Mollusca. Part I: Gastropoda-Prosobranchia. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 307: 457 -496.
- Haszprunar, G. 1988. On the origin and evolution of major gastropod groups, with special reference to the Streptoneura. *Journal of Molluscan Studies* 54: 367 -441.
- Haszprunar, G. 2000. Is the Aplacophora monophyletic? A cladistic point of view. *American Malacological Bulletin* 15: 115 -130.



- Higgins, D., J. Thompson, T. Gibson, J. D. Thompson, D. G. Higgins y T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Huelsenbeck, J. P. y F. R. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754 -755.
- Klussmann-Kolb, A., A. Dinapoli, K. Kuhn, B. Streit y C. Albrecht. 2008. From sea to land and beyond _ New insights into the evolution of euthyneuran Gastropoda (Mollusca). *BMC Evolutionary Biology* 8: 57.
- Kocot, K. M., J. T. Cannon, C. Todt, M. R. Citarella, A. B. Kohn, A. Meyer, S. R. Santos, C. Schander, L. L. Moroz, B. Lieb y K. M. Halanych. 2011. Phylogenomics reveals deep molluscan relationships. *Nature* 477: 452-456.
- Nylander, J. 2004. MrModeltest 2.3. README. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden. 2 p.
- Podsiadlowski, L, A. Braband, T. Struck, J. Von Döhren y T. Bartolomaeus. 2009. Phylogeny and mitochondrial gene order variation in Lophotrochozoa in the light of new mitogenomic data from Nemertea. *BMC Genomics* 10: 364.
- Ponder, W. F. y D. R. Lindberg. 1997. Towards a phylogeny of gastropod mollusks -an analysis using morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean Society* 19: 83 -265.
- Remigio, E. A. y P. D. N. Hebert. 2003. Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 641-647.
- Roderick, D. M. 2001. TreeView (Win32) version 1.6.6. Division of Environmental and Evolutionary Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow. <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html> 25/06/2010.
- Rota-Stabelli, O. y M. J. Telford. 2008. A multi criterion approach for the selection of optimal outgroups in phylogeny: recovering some support for Mandibulata over Myriochelata using mitogenomics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 103 -111
- Russo, C. A., N. Takezaki y M. Nei. 1996. Efficiencies of different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. *Molecular Biology and Evolution* 13: 525 -536.
- Simmons, M., T. Carr y K. O'Neill. 2004. Mitochondrial genome data alone are not enough to unambiguously resolve the relationships of Entognatha, Insecta and Crustacea sensu lato (Arthropoda). *Cladistics* 20: 534 -557.
- Smith, S. A., N. G. Wilson, F. E. Goetz, C. Feehery, S. C. S. Andrade, G. W. Rouse, G. Giribet y C. W. Dunn. 2011. Resolving the evolutionary relationships of mollusks with phylogenomic tools. *Nature* 480: 364-367.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, EE. UU. 144 p.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei y S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596 -1599.
- Tholleson, M. 1999. Phylogenetic analysis of Euthyneura (Gastropoda) by means of the 16s rRNA gene: use of a fast gene for higher-level phylogenies. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 266: 75-83.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., y Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL _ X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.
- Waller, T. R. 1998. Origin of the molluscan class Bivalvia and the phylogeny of major groups. 1-45. En: Johnston, P.A., J. W. Haggart. (Eds.). *Bivalves: an eon of evolution-Paleobiological studies honoring Norman D Newell*. University Calgary Press, Calgary, Canada. 461 p.
- Wheeler, W. C. 1990. Nucleic acid sequence phylogeny and random outgroups. *Cladistics* 6: 363-367.
- Winnepenninckx, B., G. Steiner, T. Backeljau, y R. De Wachter. 1998. Details of gastropod phylogeny inferred from 18s rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9: 55 -63.
- Wollscheid, E. y H. Wagele. 1999. Initial Results on the molecular phylogeny of the Nudibranchia (Gastropoda, Opisthobranchia) based on 18s rRNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 215 -226.
- Wolstenholme, R. 1992. Animal mitochondrial DNA structure and evolution. *International Review of Cytology* 141: 173 -216.
- Yu, Z., Z. Wei, X. Kong y W. Shi. 2008. Complete mitochondrial DNA sequence of oyster *Crassostrea hongkongensis*-a case of "Tandem duplication-random loss" for genome rearrangement in *Crassostrea*? *BMC Genomics* 008 (9): 477.

